

DELPHION

No active trail

Select ER**Stop Tracking****RESEARCH****PRODUCTS****INSIDE DELPHION****Log Out** **Work Files** **Saved Searches****My Account****Search:** Quick/Number Boolean Advanced Derwent**Help****Derwent Record** [Email this to a friend](#)**View:** [Expand Details](#) **Go to:** [Delphion Integrated View](#)**Tools:** Add to Work File: [Create new Work File](#)  **Add****Derwent Title:** **New packaging cell line for E1-deleted adenovirus****Original Title:** ☒ **DE19754103A1:** Verpackungszelllinie zur Produktion von E1 deletierten Adenoviren**Assignee:** **HEPAVEC GENTHERAPIE AG** Non-standard company**Inventor:** **CICHON G; JENNINGS G; STRAUSS M;****Accession/** **1999-338837 / 199929****Update:****IPC Code:** **C12N 5/10 ; A61K 48/00 ; C12N 15/79 ;****Derwent Classes:** **B04; D16;****Manual Codes:** **B04-F0100E**(Cells, microorganisms, transformants, hosts, cell lines, tissue [general] (genetically engineered)) , **B14-H01**(Anticancer general and other) , **D05-H12B2**(Engineered mutant sequences) , **D05-H12E**(Vectors) , **D05-H12F** (Recombinant viruses [excluding viral vectors]) , **D05-H14B2**(Recombinant mammalian cells)**Derwent Abstract:** (DE19754103A) **Novelty** - A packaging cell line (A) for producing E1-deleted adenovirus is new and comprises the liver cell line HepZ (DSM ACC 2302) with additional insertions of the minimal adenoviral E1 region and anti-apoptotic genes (I).
ACTIVITY - Antitumor.**MECHANISM OF ACTION** - Induction of apoptosis.**Use** - (A) are used to produce recombinant adenoviral vectors, particularly those that include apoptosis-inducing genes. These vectors are used for somatic gene therapy of tumors.**Advantage** - The minimal E1 region provides necessary helper functions required for replication of E1-deleted virus, but does not permit recombination to produce replication-competent particles. Incorporation of (I) allows preparation of vectors containing apoptosis-inducing genes, but these do not induce apoptosis in producer cells, although they can after transfer to tumor cells. HepZ has a high capacity for protein-synthesis and the E2F gene used for immortalization has an additional stimulatory effect on adenoviral gene expression, resulting in yields of virus greater than those obtained with known cell lines. In addition this cell line is free of endogenous viruses.Dwg.0/0**Family:** **PDF Patent** **Pub. Date** **Derwent Update** **Pages** **Language** **IPC Code**☒ **DE19754103A1** * 1999-06-10 199929 3 German C12N 5/10

Local appls.: DE1997001054103 Filed:1997-12-08 (97DE-1054103)

.....

INPADOC **Show legal status actions**
Legal Status:**First Claim:** 1. Neue Verpackungszelllinie zur Produktion von E1 deletierten Adenoviren, **gekennzeichnet**
[Show all claims](#) **durch** die Leberzelllinie HepZ (DSM ACC 2302) mit den zusätzlichen Insertionen

- a) der minimalen E1-Region von Adenoviren und
- b) von antiapoptischen Genen.

Priority Number:

--	--	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Application Number	Filed	Original Title
DE1997001054103	1997-12-08	

Related
Accessions:

Accession Number	Type	Derwent Update	Derwent Title
C1999-099853	C		
1 item found			

Title Terms: NEW PACKAGE CELL LINE DELETE ADENOVIRUS

[Pricing](#) [Current charges](#)

Derwent Searches:	Boolean Accession/Number Advanced
--------------------------	---

Data copyright Thomson Derwent 2003



Copyright © 1997-2005 The Thomson Corporation

[Subscriptions](#) | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact Us](#) | [Help](#)

THIS PAGE BLANK (USPTO)



①9 **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 54 103 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁶:
C 12 N 5/10
C 12 N 15/79
A 61 K 48/00

⑲ Aktenzeichen: 197 54 103.8
⑳ Anmeldetag: 8. 12. 97
㉓ Offenlegungstag: 10. 6. 99

DE 197 54 103 A 1

⑦1 Anmelder:
HepaVec AG für Gentherapie, 13125 Berlin, DE

⑦2 Erfinder:
Strauss, Michael, Prof. Dr., 13156 Berlin, DE;
Cichon, Günter, Dr., 10785 Berlin, DE; Jennings,
Gary, Dr., 13189 Berlin, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤4 Verpackungszelllinie zur Produktion von E1 deletierten Adenoviren

⑤7 Die Erfindung betrifft eine Verpackungszelllinie zur Produktion von E1 deletierten Adenoviren. Anwendungsgebiete sind die Gentechnik, die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Ausgangspunkt der Verpackungszelllinie ist die Leberzelllinie HepZ (DSM ACC 2302).

Diese Linie wird in folgender Weise verändert:

a) Die E1-Region von Adenoviren wird mit ihrer minimalen DNA-Sequenz stabil in die Zellen integriert, insbesondere unter der Kontrolle eines Promoters wie des starken und hepatozytenspezifischen Hybridpromoters E1ImCMV. Besonders bevorzugt ist die adenovirale E1-Region des Serotyps 5 von Nukleotid 459 bis 3518.

b) Es werden antiapoptotische Gene eingeführt. Bevorzugte Gene sind Bc1-2 (besonders bevorzugt Bc1-x_L), E1B 19K des Adenovirus und p35 des Baculovirus.

DE 197 54 103 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine Verpackungszelllinie zur Produktion von E1 deletierten Adenoviren. Anwendungsgebiete sind die Gentechnik, die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Rekombinante Adenoviren, die zu medizinischen Zwecken bei einer somatischen Gentherapie oder zur Tumorthherapie eingesetzt werden sollen, dürfen nach Gentransfer in den Zielzellen nicht mehr replizieren, um ein unkalkulierbares gesundheitliches Risiko für den Empfänger zu vermeiden.

Die Fähigkeit zur Virusreplikation nach Infektion setzt ein weitgehend intaktes virales Genom voraus und kann durch Entfernung essentieller Genfunktionen blockiert werden. Bei den zur Zeit verwendeten Adenoviren wird eine künstliche, 3180 Basenpaare umfassende, Deletion in der sogenannten E1-Region vorgenommen (An efficient and flexible system for the construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early region 1 and 3. A. Bett, W. Haddara, L. Prevec and F.L. Graham, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994), 91. 8802-8806). Da die entfernten E1-Gene aber grundsätzlich zur Produktion von Adenoviren notwendig sind, müssen diese von der Zelllinie, auf der die Virusproduktion erfolgen soll, supplementiert werden.

Zelllinien, die zur Produktion von E1 deletierten Adenoviren (E1* Adenoviren) verwendet werden, sollten aus diesem Grund adenovirale E1 Gene stabil exprimieren.

293-Zellen

Die erste und lange Zeit einzige Zelllinie zur Produktion von E1* Adenoviren sind die "293-Zellen". 293-Zellen sind aus primären embryonalen Nierenzellen nach Immortalisierung durch stabile Expression adenoviraler E1 Gene hervorgegangen (Characteristics of Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5, F.L. Graham and J. Smiley, J gen Virol (1977), 36, 59-72). Exakte Angaben über die in 293-Zellen integrierten viralen Gene existieren nicht. 293-Zellen tragen wahrscheinlich 12% vom 5'Ende des linearen Virusgenoms (in 4-5 Kopien) und 10% des 3'Endes (in 1 Kopie). 293-Zellen haben für die Haltung in Zellkultur günstige Wachstumseigenschaften und erlauben eine hochtitrige Produktion von E1* Adenoviren.

Nachteile von 293-Zellen

293-Zellen tragen in ihrem Genom adenovirale Sequenzen, die mit viralen Sequenzen im E1* Vektor identisch sind. Dies betrifft besonders den Bereich, der das adenovirale Verpackungssignal enthält. Über diese homologen Sequenzen kann es zu einer Rekombination mit der möglichen Folge einer Wildtypvirusentstehung kommen. Die homologen Bereiche sind nicht essentiell für die Verpackungsfunktion und können entfernt werden.

Die Produktion therapeutischer E1* Adenoviren nach GMP Kriterien erfordert weitgehende Freiheit von Wildtypviren und macht die Etablierung neuer Zelllinien notwendig, in denen das Risiko von Wildtyprekombination so niedrig wie möglich gehalten werden soll.

Neue adenovirale Verpackungslinien

Es existieren bislang nur wenige (3 publizierte) nicht von 293-Zellen abgeleitete E1 positive Zelllinien, die zur Produktion von E1 Viren verwendet werden können.

Imler und seine Kollegen haben eine Lungencarcinomlinie als Ausgangslinie verwendet (Novel complementation

cell lines derived from human lung carcinoma A549 cells support the growth of E1-deleted adenovirus vectors, J.L. Imler and M. Methali, Gene Therapy (1996) 3, 75-84). Das für die Etablierung der stabilen Linie verwendete E1-Konstrukt enthält kein Verpackungssignal mehr. Allerdings sind am 3'Ende noch 510 Basenpaare homolog zu Vektorsequenzen, so daß hier eine homologe Rekombination theoretisch denkbar ist. Hinzu kommt eine Stopmutation im Leserahmen des 55kd E1B Proteins, die dazu führt, daß kein E1B 55kd Protein im Zellsatz mehr nachgewiesen werden kann und sich die antiapoptotische Wirkung wahrscheinlich auf das 19 kd Protein beschränkt.

Die zweite Linie ist durch Immortalisierung von humanen embryonalen Retinoblasten mit adenoviralen E1 Genen entstanden (Characterization of 911; A new helper cell line for the titration and Propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors, J.F. Fallaux and A.J. van der Eb, Human Gene Therapy (1996), 7, 215-222). Bei dem zur Immortalisierung verwendeten E1 Konstrukt (Ad-Xhol) handelt es sich um ein Plasmid, das am 5'Ende das komplette Verpackungssignal und am 3'Ende über 2200 Basenpaare homologer Sequenzen enthält. Die Wahrscheinlichkeit einer Wildtyprekombination ist damit der in 293-Zellen vergleichbar.

Die dritte Zelllinie ist ebenfalls durch Immortalisierung von humanen embryonalen Retinoblasten entstanden (PER.C6: A novel helper cell line for RCA-free production of E1-deleted recombinant adenovirus vectors, F.J. Fallaux, R.C. Hoebe, Kongreßbeitrag, Gene Therapy and Molecular Biology International Conference, Heraklion, Greece, 1997). Das verwendete E1-Konstrukt wurde am 5' und 3'Ende in einer Weise trunziert, bei der keine Überlappung mit Vektorsequenzen mehr möglich ist. Die Zellen erlauben eine hochtitrige Virusproduktion und gewährleisten ein hohes Maß an Sicherheit vor Wildtyprekombinationen. Zusätzlich zu den 19 und 55kd E1B Proteinen enthalten diese Zellen keine weiteren antiapoptotischen Gene.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine neue Zelllinie zur Herstellung von E1-deletierten Adenoviren, insbesondere zur Herstellung von Apoptose-induzierenden adenoviralen Vektoren zu entwickeln. Dabei ist das Problem zu lösen, daß die Apoptose nicht schon in der Produktionslinie eintritt. Es soll ferner ausgeschlossen werden, daß im Verlaufe der Vektorproduktion eine Wildtyprekombination eintritt.

Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen 1 und 9 realisiert, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten. Ausgangspunkt der Verpackungszelllinie ist die Leberzelllinie HepZ (DSM ACC 2302).

Diese Linie wird in folgender Weise verändert:

a) Die E1-Region von Adenoviren wird mit ihrer minimalen DNA-Sequenz stabil in die Zellen integriert, insbesondere unter der Kontrolle eines Promoters wie des starken und Hepatozyten-spezifischen Hybridpromoters E1fCMV. Besonders bevorzugt ist die adenovirale E1-Region des Serotyps 5 von Nukleotid 459 bis 3518.

b) Es werden antiapoptotische Gene eingeführt. Bevorzugte Gene sind Bcl-2 (besonders bevorzugt Bcl-x_L), E1B 19K des Adenovirus und p35 des Baculovirus.

Die E1-Region hat eine Helferfunktion für die Vermehrung von E1-deletierten Adenoviren. Die minimale Länge der E1-Sequenz gibt die Sicherheit, daß keine Kontamination durch replikationsfähige Viren durch Rekombination eintritt. Die eingeführten antiapoptotischen Gene führen dazu, daß Vektoren mit apoptoseinduzierenden Genen produziert

werden, welche schließlich in den Tumorzellen Apoptose induzieren.

Die Einführung der beiden Faktoren a) und b) erfolgt gemäß der Erfindung in folgender Weise. HepZ-Zellen werden in an sich üblicher Weise mit Plasmiden behandelt, die die einzuführenden Gene enthalten (entweder auf einem Plasmid oder auf 2 Plasmiden). Ein gleichzeitig eingeführter Resistenzmarker erlaubt die Selektion der positiven Klone.

Die erfindungsgemäß von der Linie HepZ (DSM ACC 2302) abgeleiteten E1 positiven Zelllinien enthalten keine zum Vektor homologen Sequenzen. Dadurch wird jede Möglichkeit einer Wildtyprekombination ausgeschlossen. Die zusätzliche Expression von Antiapoptosegenen erlaubt darüberhinaus die Produktion von Vektoren mit apoptoseinduzierenden Genen für die Tumorthherapie.

HepZ ist als Ausgangszelllinie für die erfindungsgemäße Verpackungszelllinie besonders geeignet. Sie ist eine humane Hepatozytenlinie mit hoher Proteinsynthesekapazität, welche auch zu hohen Viruserträgen führt. Das unter anderem zur Immortalisierung dieser Zellen verwendete E2F-Gen führt zu einer zusätzlichen Stimulierung der adenoviralen Genexpression und damit zu maximalen Virusaussbeuten, wie sie mit den bisher existierenden Zelllinien nicht erreichbar sind.

Die Vorteile der erfindungsgemäßen neuen Zelllinie bestehen vor allem darin, daß es sich um eine humane Zelllinie handelt, die außerdem auch keine endogenen Viren enthält.

Patentansprüche

1. Neue Verpackungszelllinie zur Produktion von E1 deletierten Adenoviren, **gekennzeichnet durch** die Leberzelllinie HepZ (DSM ACC 2302) mit den zusätzlichen Insertionen
 - a) der minimalen E1-Region von Adenoviren und
 - b) von antiapoptischen Genen.
2. Neue Verpackungszelllinie nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die E1-Region an den Hybridpromoter E1ImCMV gekoppelt ist.
3. Neue Verpackungszelllinie nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die E1-Region die Sequenz von Nukleotid 459 bis 3518 enthält.
4. Neue Verpackungszelllinie nach Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß als antiapoptisches Gen das Gen für Bcl-x_L eingesetzt wird.
5. Neue Verpackungszelllinie nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß als antiapoptisches Gen das Gen für Bcl-2 eingesetzt wird.
6. Neue Verpackungszelllinie nach Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß als antiapoptisches Gen eine zusätzliche Kopie des Adenovirusgens E1B 19K eingesetzt wird.
7. Neue Verpackungszelllinie nach Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß als antiapoptisches Gen das Gen für p35 des Baculovirus eingesetzt wird.
8. Neue Verpackungszelllinie HepZ-Promoter E1ImCMV-minimal E1 (Nukleotide 459-3518)-Bcl-x_L.
9. Verwendung der neuen Verpackungszelllinie gemäß Anspruch 1-8 zur Herstellung von rekombinanten Adenovirusvektoren.
10. Verwendung der neuen Verpackungszelllinie gemäß Anspruch 1-8 zur Herstellung von rekombinanten Adenovirusvektoren mit apoptoseinduzierenden Genen.

- Leerseite -